

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**REAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS À DOENÇA PÉ-PRETO E
CONTROLE BIOLÓGICO DE *Campylocarpon pseudofasciculare* EM
VIDEIRA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Leise Inês Heckler

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**REAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS À DOENÇA PÉ-PRETO E
CONTROLE BIOLÓGICO DE *Campylocarpon pseudofasciculare* EM
VIDEIRA**

Leise Inês Heckler

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de

Mestre em Agronomia

Orientadora: Profa. Elena Blume

Santa Maria, RS, Brasil.

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo autor.

© 2015 Todos os direitos autorais reservados a Leise Inês Heckler. Endereço eletrônico: leiseheckler@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
Programa de Pós-Graduação em Agronomia

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

**REAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS À DOENÇA PÉ-PRETO E
CONTROLE BIOLÓGICO DE *Campylocarpon pseudofasciculare* EM
VIDEIRA**

elaborada por
Leise Inês Heckler

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA

Elena Blume, PhD. (Presidente/orientador)

Josiane Pacheco Menezes, Dra.

Marcus André Kurtz Almança, Dr.

Santa Maria, 27 de julho de 2015.

Aos meus pais Odilo e Nair, pela
educação que me foi dada.

Dedico-lhes este trabalho

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado a vida e ter me acompanhado em cada passo dessa caminhada.

Aos meus pais, Odilo Alfredo Heckler e Nair Maria Heckler, por terem permitido que eu saísse de casa e fosse à busca dos meus sonhos, pelo apoio, amor incondicional e, principalmente, por acreditarem em mim. E aos meus irmãos, Leila, Léia e Leandro Heckler, pelo carinho e apoio.

Ao meu companheiro Luciano Minuzzi, pelo amor, compreensão e ajuda durante essa jornada.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, pela oportunidade de me formar mestre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado.

À Elena Blume, que mesmo à distância, prontificou-se a me orientar.

À professora Marlove Fátima Brião Muniz, pela co-orientação e pela ajuda e orientação que foi dada.

À banca examinadora, Josiane Pacheco Menezes, Marcus André Kurtz Almança e Elena Blume, muito obrigada.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia, pelas conversas, risadas e ajuda que me foi dada sempre que preciso. Ricardo Feliciano dos Santos, por me conduzir a esta pesquisa. Aos bolsistas Gabriel e Priscila, que estavam sempre dispostos a ajudar.

À Maria Neves, pelos conselhos e consolos.

À Lucas Garrido e a EMBRAPA Uva e Vinho de Bento Gonçalves, que cederam as mudas de porta-enxertos necessárias à condução do experimento.

Às empresas Itaforte Bio Produtos, Empresa Caxiense de Controle Biológico Ltda, Ballagro Agro Tecnologia, Cema Agricultura Biológica, Grupo Farroupilha e BASF, que doaram seus produtos, permitindo que o trabalho fosse realizado.

Aos meus amigos, que mesmo de longe e indiretamente, ajudaram na condução deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Universidade Federal de Santa Maria

REAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS À DOENÇA PÉ-PRETO E CONTROLE BIOLÓGICO DE *Campylocarpon pseudofasciculare* EM VIDEIRA

Autor: Leise Inês Heckler

Orientadora: Elena Blume

Local da defesa e data: Santa Maria, 27 de julho de 2015.

A doença pé-preto da videira tem ocorrência descrita na maioria das grandes regiões vitícolas do mundo. No Brasil, há mais de uma década pesquisadores relataram a ocorrência da doença na região da Serra Gaúcha. A doença está associada principalmente a fungos do gênero *Campylocarpon* e *Ilyonectria*. Por se tratarem de patógenos de solo, seu controle é limitado e pouco se sabe sobre a utilização de produtos biológicos ou de porta-enxerto resistente. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi avaliar produtos comerciais à base de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. no controle de *Campylocarpon pseudofasciculare* e verificar a ocorrência de resistência em diferentes porta-enxertos a *Campylocarpon pseudofasciculare* e *Ilyonectria macrodidyma*. Foram realizados ensaios *in vitro* no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria, a fim de verificar a eficiência de espécies dos gêneros *Trichoderma* e *Bacillus*, oriundas de produtos comerciais, no controle do patógeno, através do método de pareamento de culturas e metabólitos voláteis. Também foi realizado teste *in vivo*, em casa de vegetação, para avaliar o potencial de biocontrole dos produtos comerciais sobre o patógeno inoculado em mudas de *Vitis vinifera* cv. Bordô, enxertadas em Paulsen 1103. Além disso, em casa de vegetação, foi estudada a reação de porta-enxertos inoculados com *Campylocarpon pseudofasciculare* e *Ilyonectria macrodidyma*. No ensaio de pareamento de culturas com os produtos à base de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp., o valor médio de inibição de crescimento micelial foi de 46 e 41%, respectivamente. No teste de metabólitos voláteis, isolados de *Trichoderma* spp. controlaram o patógeno, com média de redução de crescimento micelial de 61,5%. Em ensaio *in vivo*, todos os tratamentos com produtos foram capazes de controlar os sintomas da doença, quando comparados ao tratamento que recebeu apenas o patógeno, indicando que esses produtos são capazes de diminuir a severidade da doença em plantas de videira. No ensaio de reação de porta-enxertos, todas as plantas se mostraram suscetíveis aos patógenos.

Palavras-chave: *Vitis* spp., *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp., patógeno de solo.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Universidade Federal de Santa Maria

ROOTSTOCKS REACTION TO BLACK FOOT AND BIOLOGICAL CONTROL OF *Campylocarpon pseudofasciculare* ON VINE

Author: Leise Inês Heckler

Adviser: Elena Blume

Place of the defense and date: Santa Maria, 27 Julyth, 2015.

Black foot disease has described occurrence in most major wine-growing regions of the world. In Brazil, for over a decade researchers have reported the occurrence of the disease in the Serra Gaúcha region. The disease is associated mainly with fungi of the genera *Campylocarpon* and *Ilyonectria*. Because these are soil-borne pathogens, their control is limited and little is known about the use of biological products or use of resistant rootstocks. Therefore, the objective of this study was to evaluate commercial products based on *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. in controlling *Campylocarpon pseudofasciculare* and check the occurrence of resistance in different rootstocks to *Campylocarpon pseudofasciculare* and *Ilyonectria macrodidyma*. Tests were carried out *in vitro* in the Phytopathology Laboratory for Universidade Federal de Santa Maria, in order to verify the efficiency of species of the genera *Trichoderma* and *Bacillus* from commercial products in pathogen control, through the method of pairing cultures and volatile metabolites. *In vivo* test was performed in a greenhouse to evaluate the potential for biocontrol of commercial products against the pathogen inoculated in *Vitis vinifera* seedlings cv. Bordô, grafted on Paulsen 1103. In addition, in the greenhouse, the reaction was studied in rootstocks inoculated with *Campylocarpon pseudofasciculare* and *Ilyonectria macrodidyma*. The pairing cultures test with products based on *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. showed an average value of mycelial inhibition growth of 46 and 41%, respectively. In the test of volatile metabolites isolates of *Trichoderma* spp. better controlled the pathogen, with an average reduction of mycelial growth of 61.5%. In *in vivo* testing for biocontrol *Bacillus subtilis* increased the length and dry weight of shoot and all treatments had better parameters than the treatment that received only the pathogen, indicating that these products are able to lessen the severity of the disease on vine plants. In the reaction test, all rootstock proved susceptible to the pathogens.

Keywords: *Vitis* spp., *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp., soil pathogen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Sintomas da doença pé-preto em videira: **A)** murchamento repentino de parte aérea; **B)** ausência de brotação; **C)** corte transversal de raízes infectadas mostrando escurecimento nos vasos do xilema e floema; **D)** redução de massa e necrose radicular. Fonte: Santos, 2013.20
- Figura 2** Efeito dos dez tratamentos no desenvolvimento de plantas de videira inoculadas com *Campylocarpon pseudofasciculare*.41
- Figura 3.** Sintomas em porta-enxertos após teste de patogenicidade. **A)** planta morta, tratada com Cy15UFSM; **B)** planta controle, sem sintomas em parte aérea; **C)** necrose interna do caule; **D)** planta controle, sistema radicular volumosos; **E)** planta tratada com Cy15UFS.56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados de <i>Campylocarpon pseudofasciculare</i> utilizados nos experimentos.....	30
Tabela 2. Produtos à base de <i>Bacillus</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp. testados nos experimentos...32	
Tabela 3. Inibição (%) do crescimento micelial de isolados de <i>Campylocarpon pseudofasciculare</i> em cultivo pareado com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Bacillus</i> spp. <i>in vitro</i>	37
Tabela 4. Inibição (%) de crescimento micelial de isolados de <i>Campylocarpon pseudofasciculare</i> expostos a metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Bacillus</i> spp. <i>in vitro</i>	39
Tabela 5. Efeito de diferentes produtos de controle biológico no comprimento da maior raiz formada (CR, cm), comprimento do ramo principal (CRP, cm), número de nós no ramo principal (NNRP), número total de nós (NTN), número total de ramos (NTR), peso seco de parte aérea (PSPA, g), peso seco de raiz (PSR, g) e taxa de reisolamento do patógeno (RI, %) em videiras cv. Bordô inoculadas com <i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	42
Tabela 6 Porta-enxertos de videira utilizados na condução do experimento de resistência a <i>Campylocarpon pseudofasciculare</i> e <i>Ilyonectria macrodidyma</i>	50
Tabela 7 Severidade em raízes, observados no teste de resistência de porta-enxertos de videira a <i>Campylocarpon pseudofasciculare</i> (Cy14UFMS) e <i>Ilyonectria macrodidyma</i> (Cy15UFMS).	53
Tabela 8 Severidade em parte aérea, observados no teste de reação de porta-enxertos de videira aos patógenos <i>Campylocarpon pseudofasciculare</i> (Cy14UFMS) e <i>Ilyonectria macrodidyma</i> (Cy15UFMS).	54
Tabela 9 % de reisolamento obtida no teste de reação de porta-enxertos de videira aos patógenos <i>Campylocarpon pseudofasciculare</i> (Cy14UFMS) e <i>Ilyonectria macrodidyma</i> (Cy15UFMS).	55

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
Histórico da videira	16
Doença pé-preto da videira	17
Etiologia.....	18
Sintomatologia	19
Epidemiologia	21
Métodos de controle.....	22
REFERÊNCIAS	24
CAPÍTULO 1	28
INTRODUÇÃO	28
MATERIAL E MÉTODOS	30
Mudas de videira.....	30
Isolados de <i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	30
Produtos Biológicos.....	31
Experimento de controle biológico <i>in vitro</i>	33
Pareamento de culturas	33
Metabólitos voláteis	33
Experimento de biocontrole <i>in vivo</i>	34
Delineamento experimental e análise estatística	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
Testes <i>in vitro</i>	36
Pareamento de culturas	36
Metabólitos voláteis	38
Teste <i>in vivo</i>	40
REFERÊNCIAS	45
CAPÍTULO 2	48
INTRODUÇÃO	48
MATERIAL E MÉTODOS	49
Mudas de porta-enxertos.....	49

Isolados de <i>Ilyonectria macrodidyma</i> e <i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	50
Experimento reação de porta-enxertos a <i>Ilyonectria macrodidyma</i> e <i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	50
Delineamento experimental e análise estatística	52
RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
REFERÊNCIAS	57

INTRODUÇÃO GERAL

A videira é uma frutífera pertencente à família Vitaceae, gênero *Vitis* e é uma das culturas mais antigas que se têm relatos. A cultura tem grande importância mundial e, tendo sido introduzida no Brasil com a chegada dos portugueses, hoje fomenta o setor de fruticultura, pois o país tem capacidade de produzir o ano todo. Seu cultivo ocorre do Sul até o Nordeste, mas a região Sul é a responsável pela maior parte da produção nacional, com destaque para a Serra Gaúcha. As uvas produzidas no estado do Rio Grande do Sul são utilizadas na fabricação de vinhos, sucos e outros derivados, revelando sua grande importância econômica, pois empregam mão-de-obra, incentivam o comércio local e regional e contribuem com a fixação de pessoas no campo.

A produtividade e a qualidade das videiras e uvas produzidas podem ser afetadas por inúmeros fatores bióticos e abióticos. Entre os fatores bióticos destacam-se as doenças, que podem comprometer toda produtividade em um vinhedo. Doenças do tronco da videira estão entre as que mais causam perdas no mundo todo. Desde a década de 90 há um grande interesse nessa doença sendo criado “International Council on Grapevine Trunk Diseases (ICGTD)”, com o intuito de conhecer melhor essas doenças e encontrar formas de controle e redução de danos.

Entre as doenças do troco da videira, destaca-se aquela conhecida como pé-preto, que é responsável por grandes danos em viveiros e vinhedos jovens. Ela era associada ao gênero *Cylindrocarpon*, que foi dividido em cinco gêneros e atualmente a doença é atribuída principalmente a dois gêneros fúngicos *Campylocarpon* e *Ilyonectria*, que têm sido relatados em regiões vitícolas em todo mundo. No Brasil, recentemente foram encontrados ambos patógenos infectando plantas de videira em vinhedos na Serra Gaúcha. Fungos desses gêneros são encontrados naturalmente nos solos, podendo ser patogênicos ou não.

Sintomas típicos da doença pé-preto vêm sendo observados e relatados no Brasil desde a década de 90, caracterizando-se pela redução do número de brotações e vigor, clorose e murchamento da parte aérea, que evoluem até a morte da planta. Nas raízes, ocorre redução de massa, são observadas necroses que podem comprometer todo sistema radicular, causando apodrecimento no colo da planta. Também surgem necroses e ocorre completo escurecimento do interior do caule.

A entrada do patógeno na planta se dá pelas raízes ou pelas extremidades basais do porta-enxerto. Isolados fúngicos causadores de pé-preto foram encontrados causando danos em videiras viníferas e de uvas para mesa. Esses gêneros também são relatados causando sintomas da doença em outras culturas agrícolas como milho e colza e em outras frutíferas como macieira, abacate e kiwi.

Por se tratarem de patógenos de solo, seu controle é restrito, além da dificuldade de visualização dos sintomas da doença, que só ocorre quando as plantas já estão comprometidas. Formas de controle dos patógenos ainda são pouco conhecidas e o uso de fungicidas tem se mostrado pouco eficiente. Devem ser consideradas, então, formas alternativas de manejo da doença, como o uso de agentes biológicos e a busca de porta-enxertos que possam proporcionar algum grau de resistência à doença, aliadas a boas práticas de manejo como aquisição de mudas saudáveis, evitar compactação do solo e realizar drenagem da área.

O controle biológico de doenças de plantas pode ser definido como a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença considerada patogênica, ocorrendo naturalmente ou não, através de um organismo antagonista e/ou pela manipulação do ambiente. Esses organismos antagonistas, podem controlar de forma direta os patógenos, ou agir sobre a planta, de forma a aumentar sua resistência, os mecanismos de ação que eles utilizam são antibiose, competição, parasitismo, predação, hipovirulência, além de desencadear uma série de alterações morfológicas e bioquímicas na planta, levando à ativação dos mecanismos de defesa da planta, contra vários patógenos. O controle biológico, diferente do químico, não erradica completamente organismos patogênicos, mas os mantém em quantidades baixas suficientes para impedir grandes danos às plantas.

Entre os microrganismos mais empregados no controle biológico estão os gêneros *Bacillus* e *Trichoderma*, que são encontrados naturalmente nos solos e têm ação comprovada sobre patógenos, tanto de solo como de parte aérea. Como esses microrganismos não tem ação seletiva, sua utilização proporciona controle amplo sobre os fitopatógenos. Também são apontados como promotores de germinação e de crescimento, ocorrendo incremento de massa verde e de raízes.

A escolha de um material genético que ofereça resistência à doença pode reduzir drasticamente os custos de produção além de melhorar a qualidade do vinhedo. A utilização de biofungicidas a base de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. também é uma opção de diminuir custos além de poderem atuar sobre outros patógenos presentes no solo. Esses dois gêneros de

microrganismos vêm sendo utilizados para controle de inúmeras doenças, principalmente de solo, e apresentam bons resultados de controle.

Diante do exposto, este trabalho objetivou testar a resistência de diferentes porta-enxertos de videira a *Campylocarpon pseudofasciculare* e *Ilyonectria macrodidyma*, em casa de vegetação e verificar a eficiência de produtos à base de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. no controle de *Campylocarpon pseudofasciculare* *in vitro* e *in vivo*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Histórico da videira

A videira é uma planta pertencente à família *Vitaceae*, gênero *Vitis*, e é considerada uma das culturas mais antigas do mundo (QUEIROZ-VOLTAN; PIRES, 2003). É uma planta que surgiu no período terciário, antes mesmo da origem do homem. Um dos focos de desenvolvimento das videiras foi na América do Norte, em áreas do leste dos Estados Unidos da América e México, centro de origem das videiras do gênero *Vitis* e sub-gênero *Euvites*, que compreendem mais de 50 espécies (ALVARENGA et al., 1998). Esses compreendem as espécies *labrusca*, *aestivalis*, *rupestres*, *riparia* e *cordifolia*. Outro centro de origem é a Europa, nas áreas mediterrâneas da Itália e França até a península balcânica, de onde se origina a *Vitis vinifera silvestres* (POMMER, 2003).

No Brasil, a introdução da videira se deu ainda no século XVI, por Martin Afonso de Sousa. Inicialmente, foram introduzidas mudas no litoral paulista, onde não houve adaptação, sendo, então, levadas a várias partes do país. Em 1879, Portugal selou uma lei que proibia o cultivo da videira no país, a fim de proteger seu mercado. Porém, com a vinda da corte ao Brasil, essa proibição teve fim e, nos anos seguintes, com a vinda da colonização Alemã e italiana, a cultura se expandiu e teve maior sucesso na Serra Gaúcha (IBRAVIN, 2010), onde é cultivada com expressividade, nos dias atuais. A princípio, foram trazidas apenas cultivares europeias ao país, sendo bastante suscetíveis a doenças e, devido ao clima da Serra Gaúcha, não se desenvolveram bem. Somente a partir de 1840, com a introdução de cultivares americanas como a Isabel, que eram mais adaptadas ao clima e ao solo do estado, que a região ganhou expressão na produção de uvas (POMMER, 2003).

A Estação de Enologia de Bento Gonçalves foi criada em 1937, marcando o início das pesquisas na área de viticultura. Hoje conhecida como EMBRAPA Uva e Vinho, é responsável por diversas pesquisas e projetos em parceria com instituições de ensino e, juntamente com produtores, busca viabilizar soluções tecnológicas para o desenvolvimento sustentável da vitivinicultura (EMBRAPA Uva e Vinho, 2013).

A partir da segunda metade da década de 70, iniciou uma mudança na vitivinicultura da Serra Gaúcha e, mais tarde, também na região da Campanha Gaúcha. Houve investimento

de empresas estrangeiras, com introdução de materiais genéticos mais adaptados e produtivos, impulsionamento para mecanização dos parreirais e elaboração de vinhos finos e espumantes voltados ao mercado externo. Esse movimento foi capaz de permitir que a vitivinicultura brasileira hoje seja competitiva e promissora no mercado internacional (IBRAVIN, 2010; PROTAS; CAMARGO, 2011).

No Rio Grande do Sul existem quatro principais regiões produtoras. A Serra Gaúcha e a Campanha, que representam a maior parte da produção de uvas, e as regiões Central e Serra do Sudeste, com menor expressividade. Excluindo a Campanha Gaúcha, as demais regiões caracterizam-se pela estrutura fundiária de minifúndio, com predomínio da mão-de-obra familiar (PROTAS; CAMARGO, 2011). A vitivinicultura é muito importante, pois influencia o contexto econômico da região da Serra Gaúcha, sendo responsável por empregar ‘13.268 famílias. Em torno de 90% das empresas e vinícolas são encontradas nessa região e abrangem principalmente as cidades de Bento Gonçalves, Caxias do Sul, Farroupilha, Flores da Cunha, Garibaldi, Nova Pádua, São Marcos e Veranópolis (IBRAVIN, 2003).

Na Campanha Gaúcha, encontramos uma vitivinicultura tipicamente empresarial, com grandes extensões de área cultivada, onde a mecanização está presente em todos os processos de produção, uma vez que o relevo favorece essa prática. O estado é responsável por mais de 90% da produção total de uvas no país (IBRAVIN, 2010), sendo que a maior parte é voltada à fabricação de vinhos, que representa cerca de 80% do mercado Brasileiro (CAMARGO et al, 2010). Na safra de 2014, a produção de uvas no estado chegou a mais de 600 milhões de quilos, com cerca de 90% das variedades colhidas sendo americanas e híbridas e 10% de uvas viníferas, empregadas na elaboração de vinhos finos (IBRAVIN, 2010).

Doença pé-preto da videira

A doença da videira denominada popularmente como pé-preto, juntamente com a doença de Petri são conhecidas como responsáveis pelo declínio das videiras jovens, pois elas são comumente relatadas dizimando vinhedos jovens com até dez anos. Essas doenças juntamente com a doença de Petri, esca, eutipiose e escoriose, constituem as doenças do lenho da videira. Mundialmente, o interesse sobre essas doenças teve início em 1998, com a criação do “International Council on Grapevine Trunk Diseases (ICGTD)”, a fim de estudar e melhorar

conhecer as doenças que vinham a reduzir a produtividade e a longevidade das videiras, comprometendo a sua viabilidade econômica (CHIARAPPA, 2000).

A doença pé-preto é conhecida desde 1961, relatada pela primeira vez na França, descrita e associada ao patógeno *Cylindrocarpon destructans* (Zinns.) Scholten. A doença já foi relatada em todas as principais regiões vitivinícolas do mundo (MALUTA; LARIGNON, 1991), como Califórnia, nos Estados Unidos (SCHECK et al. 1998), diversos países na Europa, como França (MALUTA; LARIGNON, 1991), Itália (GRASSO et al., 1975) e Portugal (REGO et al., 2000), e em outros continentes como a Oceania, Nova Zelândia (HALLEEN et al., 2004) e África (FOURIE; HALLEN, 2006). Na América do Sul, foi relatada no Brasil, no ano de 2001, quando foram observados sintomas da doença em vinhedos de cultivares americanas, localizados em municípios da Serra Gaúcha (GARRIDO et al., 2004).

Etiologia

Hallen et al. (2006) compararam isolados de *C. destructans* obtidos de videiras doentes da França, Portugal e África do Sul com outras espécies do gênero “*Cylindrocarpon*” obtidas de vários hospedeiros e observaram que *C. destructans* e *C. liriodendri* tinham características morfológicas idênticas. Assim, os isolados de *C. destructans* foram reidentificados como *Cylindrocarpon liriodendri* J. D. MacDon. & E. E. Butler e *C. destructans* foi associado a outros hospedeiros, e não a videira. No ano de 2008, foi descrito *Cylindrocarpon pauciseptatum*, a partir de plantas de videira com sintomas de pé-preto, porém a fase teleomórfica de *C. pauciseptatum* ainda não é conhecida (SCHROERS et al., 2008).

Historicamente, a doença pé-preto foi atribuída a um único agente causal, conhecido como *Cylindrocarpon* spp., descrito a partir da fase assexuada do seu ciclo de vida. Com o avanço nas pesquisas e técnicas moleculares, os estudos apontaram tratar-se de um complexo de espécies que é responsável por causar a doença em plantas no mundo todo. *Neonectria*, foi dividido em cinco gêneros: *Neonectria*, *Ilyonectria* P. Chaverri & C. Salgado, *Rugonectria* P. Chaverri & Samuels, *Thelonectria* P. Chaverri & C. Salgado e o gênero anamorfo *Campylocarpon* Halleen, Schroers & Crous. De acordo com essa classificação, *Neonectria*

tem *Cylindrocarpon* como anamorfo, os gêneros restantes têm anamorfos semelhantes à *Cylindrocarpon* e são referidos como "*Cylindrocarpon*" (CHAVERRI et al., 2011).

Em estudo realizado por Halleen et al. (2004), com isolados patogênicos de videiras provenientes da França, África do Sul, Nova Zelândia e Austrália, identificaram por características morfológicas *Cylindrocarpon macrodidymum* Schroers, Halleen & Crous, *Campylocarpon fasciculare* Schroers, Halleen & Crous e *Campylocarpon pseudofasciculare* Halleen, Schroers & Crous associados ao pé-preto da videira. Espécies de *Campylocarpon* possuem esporos septados (3-5 septos), macroconídios curvados e ausência de microconídios. Em meio BDA (batata, dextrose e ágar) suas colônias são acastanhadas com presença de micélio aéreo.

Cylindrocarpon destructans foi recentemente associado a um teleomorfo pertencente ao complexo *Ilyonectria radicola* e novas espécies foram descritas, sendo cinco espécies associadas ao pé-preto da videira: *Ilyonectria europaea* A. Cabral, Rego & Crous, *I. lusitanica* A. Cabral, Rego & Crous, *I. pseudodestructans* A. Cabral, Rego & Crous, *I. robusta* (A.A. Hildebr.) A. Cabral, Rego & Crous e *I. vitis* A. Cabral, Rego & Crous. (CABRAL et al, 2012). *Ilyonectria* pertence à Família *Nectriaceae* (*Sordariomycetes*; *Hypocreomycetidae*; *Hypocreales*).

Sintomatologia

Doenças do tronco da videira, são causadas por vários gêneros fúngicos, porém seus sintomas se apresentam de forma semelhante e são facilmente confundidos no campo. O declínio das videiras vem sendo relatado, desde o ano de 1990, como a principal causa da perda de vinhedos jovens e de material de propagação (GRAMAJE; ARMENGOL, 2011). A doença ocorre principalmente em videiras jovens em vinhedos recém implantados, mas pode ocorrer também em vinhedos implantados há mais de 10 anos. Neste caso, a evolução dos sintomas é mais lenta e o declínio e morte da planta podem demorar mais de um ano (GUBLER et al., 2004). Sintomas da doença de Petri podem facilmente ser confundidos com outras doenças como pé negro da videira (REGO, 2004).

Os sintomas nas plantas ocorrem na parte aérea e na região basal e raízes, onde ocorre a infecção. Segundo Garrido et al. (2004), que verificou os sintomas da doença em cultivares

de videiras americanas, ocorre a redução do vigor e do número de brotações, que evoluem para o murchamento da parte aérea e, conseqüentemente, a morte da planta (Figura 1). Também foi observado que na região do colo da planta ocorre um completo escurecimento interno, de coloração marrom escura a preta. As plantas também apresentam vegetação escassa e clorose foliar (REGO et al., 2000).

O fungo infecta as plantas pelas raízes, através de ferimentos, ou através da coroa do porta-enxerto. Há relatos da doença em diversos porta-enxertos (REGO et al., 2000). Após a infecção das raízes, o fungo atinge os tecidos lignificados da planta, produzindo lesões radiculares e posterior obstrução do xilema por micélio e esporos, ocorrendo a diminuição de absorção de água e minerais e causando o declínio da planta (HALLEEN et al., 2006).

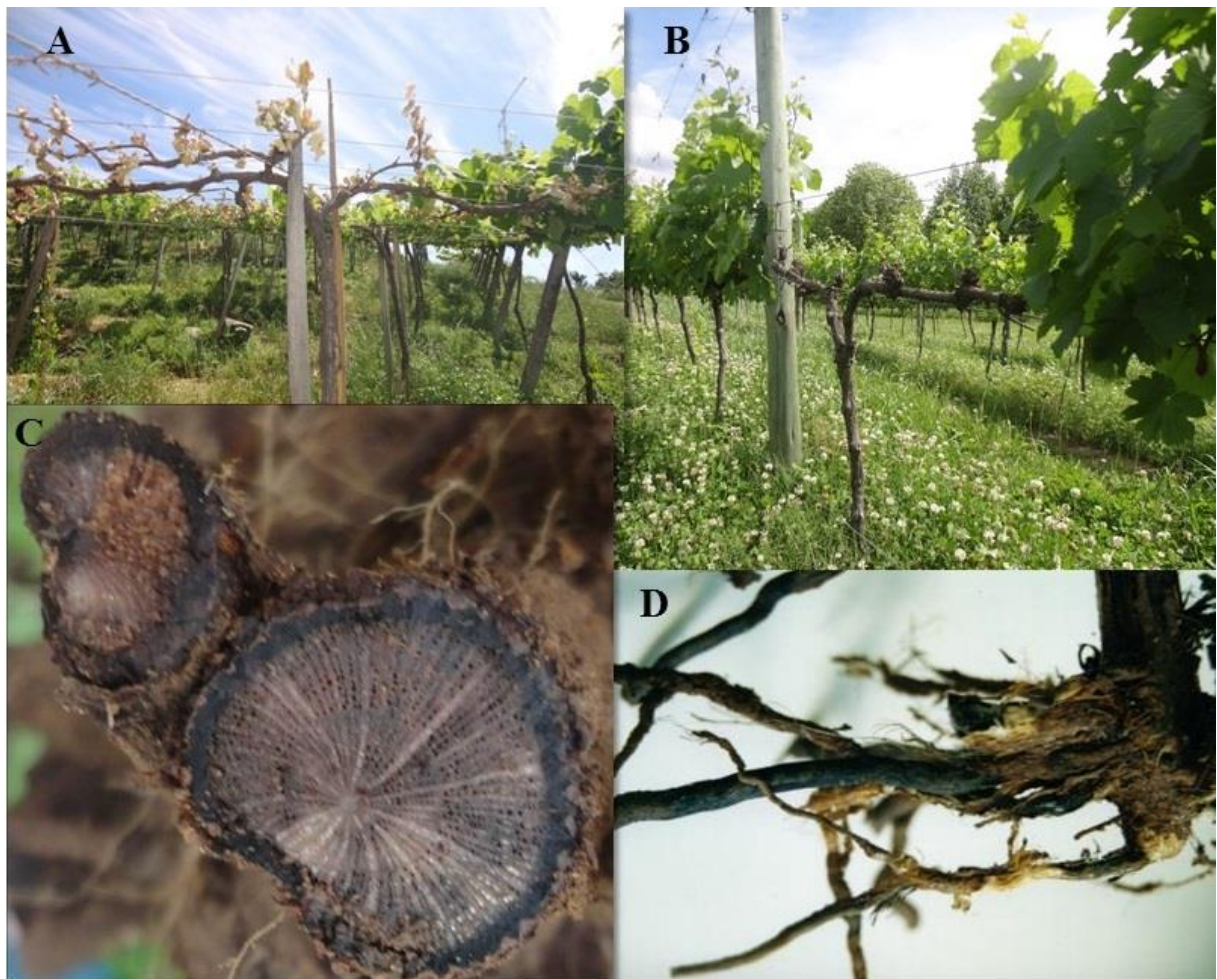


Figura 1. Sintomas da doença pé-preto em videira: **A)** murchamento repentino de parte aérea; **B)** ausência de brotação; **C)** corte transversal de raízes infectadas mostrando escurecimento nos vasos do xilema e floema; **D)** redução de massa e necrose radicular. Fonte: Santos, 2013.

Epidemiologia

Fungos do gênero “*Cylindrocarpon*” spp. são fungos necrotróficos habitantes do solo. Sua distribuição geográfica é ampla, pois já foram identificados em todos os continentes (BRAYFORD, 1993), associados principalmente a podridões de raízes. Podem ser encontrados desde as florestas tropicais até temperadas, em solos muito gelados, desde as camadas mais superficiais do solo até vários centímetros de profundidade e desenvolvem-se com baixas concentrações de oxigênio (BRAYFORD, 1993). Por isso, a doença pé-preto ocorre principalmente em vinhedos mal drenados e compactados (SCHECK et al. 1998). Apresentam especialidades competitivas como a rápida germinação de esporos, crescimento micelial acelerado e características como a utilização de nitrogênio orgânico e inorgânico (BRAYFORD, 1993). A sua sobrevivência no solo é garantida devido à capacidade que esse gênero tem de formar clamidósporos (CHAVERRI et al., 2011; HALLEEN et al., 2004).

A gama de plantas hospedeiras varia dentro das espécies do gênero “*Cylindrocarpon*”, que são patógenos associados com raízes de plantas herbáceas e lenhosas (BRAYFORD, 1993). Esse fungo está associado às raízes de inúmeras plantas, porém nem sempre age como um patógeno. O gênero *Ilyonectria* (anamorfo: “*Cylindrocarpon*”) foi relatado como patógeno em cultivos de oliveira (ÚRBEZ-TORRES et al., 2012), kiwi (ERPER et al., 2011, 2013), milho e colza (MOHAMEDI et al., 2011), macieira (TEWOLDEMEDHIN et al., 2011). O gênero *Campylocarpon* está associado a doença do tronco da videira, foi descrito pela primeira vez na África do Sul no ano de 2004 (Hallen et al., 2004).

Os materiais de propagação podem ser os principais focos de propagação da doença pé-preto, porém o manejo inadequado, como plantio em solo contaminado, uso de equipamentos e implementos contaminados também contribuem à disseminação da doença. Na França, segundo Maluta e Larignon (1991), os principais fatores associados à doença pé-preto são solos com deficiência na drenagem e a compactação do solo. Segundo Gubler et al. (2004) as infecções são mais severas quando as plantas se encontram em solos pesados e úmidos.

Métodos de controle

Atualmente, ainda não há nenhum método efetivo de controle da doença pé-preto em videiras por se tratar de um fungo de solo e pela falta de conhecimento que se tem sobre a doença, seus agentes causais e seu ciclo. Na prática, são conhecidas algumas técnicas que podem ser empregadas para evitar a instalação de patógenos e para diminuir ou minimizar seus danos. Garantir a aquisição de material sadio e livre de doenças, utilizar a rotação de cultura, tanto no viveiro quanto no vinhedo, realizar drenagem na área e evitar a compactação do solo, proporcionar às mudas jovens ambiente adequado na cova de plantio, manter os materiais utilizados no preparo do plantio desinfetados, adubar adequadamente, arrancar e queimar as plantas com sintomas, adicionar calcário e evitar o contato direto de estruturas do patógeno com a nova planta (SÔNEGO, et al. 2005).

Mudas de videira enxertadas têm demonstrado que são suscetíveis à doença. O material de enxerto VR 043-43 é um dos mais utilizados por sua resistência à pérola-da-terra (*Eurhizococcus brasiliensis* Hempel), e esse porta-enxerto se mostrou bastante suscetível a “*Cylindrocarpon*” *destructans*, ocorrendo rapidamente a morte da planta (RASERA, 2005). Alaniz et al. (2010), na Espanha, testaram isolados de “*Cylindrocarpon*” *liriodendri* e “*Cylindrocarpon*” *macrodidymum* em sete diferentes porta-enxertos (110 R, Paulsen 1103, 140 R, 161-49C, 196-17C e SO4), observando sintomas da doença em todos os materiais testados. Porém, alguns estudos relataram que os porta-enxertos *Vitis riparia* Mchx “039-16” e Freedom apresentavam algum nível de resistência a “*C*” *destructans* (GUBLER et al., 2004).

Não existe, no Brasil, nenhum fungicida químico específico para controle da doença, havendo a necessidade da busca por métodos alternativos eficientes no controle de pé-preto em videira. Fungos do gênero *Trichoderma* Persoon vêm sendo utilizados na agricultura e têm se mostrado promissores no controle biológico de doenças, pois atuam sobre muitos patógenos (PERTOT et al., 2008) através de seus mecanismos de ação, como a antibiose, competição, parasitismo, predação, hipovirulência e indução de defesa do hospedeiro (BETTIOL; MORANDI, 2009). Para verificar o controle biológico de fungos associados a doenças do tronco, mudas de videiras tiveram raízes tratadas com *Trichoderma* spp. e plantadas em substrato contendo os patógenos. Os resultados demonstraram um aumento considerável na massa da raiz (de 25,7 g para 36,5 g) e uma redução na incidência de fungos associados a pé-preto, isolados a partir das raízes, esses resultados indicam o potencial de

tratamentos com *Trichoderma* spp em viveiros (FOURIE et al., 2001). A utilização de *Trichoderma harzianum* Rifai, tem sido relatado com agente potencial de biocontrole de fungos causadores de doenças do tronco em videira (FOURIE; HALLEEN, 2006).

Petit e Gluber (2006) testaram o fungo micorrízico *Glomus intradices* N.C. Schenck & G.S. Sm. no controle de *Cylindrocarpon macrodidymum* em *Vitis rupestris* cv. St. George em condições controladas. As plantas que receberam *Glomus intradices* tinham peso de parte aérea e raízes superiores a testemunha e desenvolveram menos sintomas foliares e radiculares da doença. Testes realizados *in vitro*, demonstraram que *Bacillus subtilis* foi capaz de estagnar o crescimento de *Botrytis cinerea* Pers. Fr. e *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Saccardo (Furuya et al., 2011). Em um estudo utilizando *Bacillus subtilis* Cohn no controle de *Fusarium oxysporum* Schlecht e *Rhizoctonia solani* Kühn, em videira, foram encontrados resultados positivos, reduzindo a incidência de podridões radiculares e aumentando a atividade de enzimas oxidativas, peroxidase e polifenol oxidase nas raízes em solo infestado com os patógenos (ZIEDAN et al., 2005).

REFERÊNCIAS

- ALANIZ, S. LEON, M.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ABAD, P.; ARMENGOL, J. Susceptibility of grapevine rootstocks to *Cylindrocarpon liriodendri* and *C. macrodidymum*. **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 3, p. 305-308, 2010.
- ALVARENGA, A. A. et al. Origem e classificação botânica da videira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.19, n.194, p.5-8, 1998.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Org). **Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna – SP: Embrapa Meio Ambiente, p. 7-14, 2009.
- BRAYFORD, D. *Cylindrocarpon*. In Singleton L. L., MIHAIL J. D.; RUSH C. M. Eds. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. APS Press, St. Paul, Minnesota. 1993, p. 103-106.
- CABRAL, A. et al. *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicola* species complex. **Mycological Progress**, v. 11, p. 655-688, 2012.
- CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; RITSCHERL, P. Embrapa Uva e Vinho: **Novas cultivares brasileiras de uva**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010. 64 p.
- CHAVERRI, P. et al. Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (*Nectriaceae*, *Hypocreales*, *Ascomycota*) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. Studies in **Mycology**, v. 68, p. 57-78, 2011.
- CHIARAPPA, L. Esca (black measles) of grapevine. An overview. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 39, n. 1, p. 11-15, 2000.
- EMBRAPA UVA E VINHO. **Histórico da EMBRAPA Uva e Vinho**. Bento Gonçalves, 2013. Disponível em: < <http://www.cnpuv.embrapa.br/unidade/historico.html> > Acesso em: 13 dez 2014.
- ERPER, I. et al. Characterization of root rot disease of kiwifruit in the Black Sea region of Turkey. **European Journal of Plant Pathology**, v. 136, n. 2, p. 291-300, 2013.
- FOURIE, P. H. et al. Effect of *Trichoderma* treatments on the occurrence of decline pathogens in the roots and rootstocks of nursery grapevines. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 40, p. 473–478, 2001.

FOURIE, P. H.; HALLEEN, F. Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, v. 116, n. 4, p. 255-265, 2006.

FURUYA, S.; MOCHIZUKI, M., AOKI, Y.; KOBAYASHI, H., TAKAYANAGI, T., SHIMIZU, M.; SUZUKI, S. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* KS1 for the biocontrol of grapevine fungal diseases. **Biocontrol Science and Technology**, v. 21, p. 705-720, 2011.

GARRIDO, L. R.; SÔNEGO, O. R.; URBEN, A. F. *Cylindrocarpon destructans* causador do “pé-preto” da videira no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 548-550, 2004.

GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. **Plant Disease**, v. 95, n. 9, p. 1040-1055, 2011.

GRASSO, S.; MAGNANO, D.I.; SAN LIO, G. Infezioni di *Cylindrocarpon obtusisporium* su piante di vite in Sicilia. **Vitis**, v. 14, p. 36–39, 1975.

GUBLER, W. D. et al. Root diseases of grapevines in California and their control. **Australasian Plant Pathology**, v. 33, n. 2, p. 157-165, 2004.

HALLEEN, F. et al. Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). **Studies in Mycology**, v. 50, p. 431-455, 2004.

HALLEEN, F.; FOURIE, P. H.; CROUS, P. W. A review of black foot disease of grapevine. **Phytopatologia Mediterranea**, v. 45, p. 55-67, 2006.

IBRAVIN. INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO. **Dados Estatísticos**. Bento Gonçalves, 2003. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/dados-estatisticos>>. Acesso em 17 jan 2015.

IBRAVIN. INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO. **A Viticultura Brasileira**. Bento Gonçalves, 2010. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/brasilvitivinicola.php>>. Acesso em: 04 dez 2014.

MALUTA, D. R.; LARIGNON, P. Pied-noir: mieux vaut prévenir. **Viticulture**, v. 11, p. 7172, 1991.

MANTIRI, F. R. et al. Phylogenetic relationships in *Neonectria* species having *Cylindrocarpon* anamorphs inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences. **Canadian Journal of Botany**, v. 79, n. 3, p. 334-340, 2001.

MOHAMEDI, M. et al. Study of the *Cylindrocarpon* species associated with corn and canola crown and root rot in Khuzestan province. **Iranian Journal of Plant Pathology**, v. 47, n. 4, p. 113-115, 2011.

PERTOT, I. et al. Integrating biocontrol agents in strawberry powdery mildew control strategies in high tunnel growing systems. **Crop Protection**, v. 27, p. 622-631, 2008.

PETIT, E.; GUBLER, W. D. Influence of *Glomus intraradices* on black foot disease caused by *Cylindrocarpon macrodidymum* on *Vitis rupestris* under controlled conditions. **Plant Disease**, v. 90, n. 12, p. 1481-1484, 2006.

POMMER, C. V. **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A. Vitivinicultura brasileira: panorama setorial de 2010. **IBRAVIN: Embrapa Uva e Vinho**. Brasília-DF, 2011. 110 p.

QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; PIRES, E. J. P., C.V. Uva Tecnologia de Produção, Pós-colheita, Mercado. Porto Alegre: **Cinco Continentes**, 2003, p. 37-61.

RASERA, N. G. Análise da variabilidade genética de *Cylindrocarpon* spp., associados ao pé-preto da videira, com marcadores RAPD. 2005. 25 f. Trabalho de estágio (Conclusão do Curso Superior de Tecnologia em Viticultura e Enologia. Centro Federal de Educação)-Tecnológica de Bento Gonçalves, Bento Gonçalves, 2005.

REGO, et al. Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 39, p. 76-79, 2000.

REGO, C. Estudo e caracterização de fungos do género *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) responsáveis pelo pé-negro da videira em Portugal. 2004. 228 p. Dissertação apresentada ao Laboratório de Patologia Vegetal “Verissimo de Almeida” – Instituto Superior de Agronomia, para acesso à categoria de Investigador Auxiliar, ISA/LPVVA, UTL, Lisboa, 2004.

SCHROERS, H. J. et al. *Cylindrocarpon pauciseptatum* sp. nov. with notes on *Cylindrocarpon* species with wide, predominantly 3-septate macroconidia. **Mycological Research**, v. 112, p. 82-92, 2008.

SCHECK, H.J.; VASQUEZ, S.J.; GUBLER, W.D. First report of black-foot disease, caused by *Cylindrocarpon obtusisporum*, of grapevine in California. **Plant Disease** v. 82, p. 448, 1998.

SÔNAGO, O. R.; GARRIDO, L. da R.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Principais doenças fúngicas da videira no sul do Brasil. **Circular técnica 51**. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPUV, 2005. 32p.

TEWOLDEMEDHIN, Y. T. et al. *Cylindrocarpon* species associated with apple tree roots in South Africa and their quantification using real-time PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v. 129, p. 637-651, 2011.

ÚRBEZ-TORRES, J. R.; PEDUTO, F.; GUBLER, W. D. First report of *Ilyonectria macrodidyma* causing root rot of olive trees (*Olea europaea*) in California. **Plant Disease**, v. 96, n. 9, p. 1378, 2012.

ZIEDAN, E. H. et al. Biological control of grapevine root-rot by antagonistic microorganisms. **African Journal of Mycology and Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 19-36, 2005.

CAPÍTULO 1

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Campylocarpon pseudofasciculare* EM VIDEIRA (*Vitis vinifera* L.)

INTRODUÇÃO

A videira é uma planta pertencente à Ordem *Rhamnales*, Família *Vitaceae*, do gênero *Vitis*, cuja produção comercial de uvas é baseada nas espécies *Vitis vinifera* L., *Vitis labrusca* L., *Vitis bourquina* L. e *Vitis rotundifolia* L. (CAMARGO, 2001). No Brasil, plantações de videira podem ser encontradas nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste, onde são cultivadas uvas viníferas e de mesa. Segundo dados da Food and Agriculture Organization (FAO, 2010), das Nações Unidas, o Brasil ocupa a 15ª posição na produção mundial de uva. Essa fruta tem grande importância econômica, devido às inúmeras utilizações para consumo *in natura* e processamento (POMMER; MAIA, 2003).

Doenças do tronco da videira apresentam importância pela quantidade de danos que causam, podendo ser responsáveis pela dizimação de vinhedos. Até o início da década de 90, *Cylindrocarpon destructans* e *Cylindrocarpon obtusisporum* eram considerados os únicos responsáveis pelo pé-preto da videira (REGO, 1994), porém pesquisas revelaram se tratar de um complexo (SEIFERT et al., 2003). Essa doença foi mais recentemente associada a fungos do gênero *Ilyonectria* (anteriormente designado *Neonectria*) (CHAVERRI et al., 2011) e com a descrição das espécies em *Ilyonectria radicola* e *Ilyonectria macrodidyma* (CABRAL, et al., 2011). A doença é, também, associada a fungos do gênero *Campylocarpon*, em regiões do Hemisfério Sul (HALLEEN et al., 2004).

Garrido et al. (2004) detectaram a presença de *Cylindrocarpon destructans* no Rio Grande do Sul em videiras da variedade Bordô com sintomas de pé-preto. Porém, estudos recentes, realizados por Santos et al. (2013), demonstraram haver outras espécies associadas à doença em videiras da Serra Gaúcha, sendo relatados pela primeira vez no estado, os gêneros *Ilyonectria* spp. e *Campylocarpon* spp., em nível de gênero e espécie. Os sintomas da doença

pé-preto da videira caracterizam-se pelo retardamento da brotação na primavera, encurtamento dos entrenós, as folhas deformadas e cloróticas, com pequenas necroses nas margens, podendo murchar e cair, e redução do vigor, ocorrendo a seca de ramos e a morte da planta (GARRIDO, et al. 2004). Até o momento não há medidas de controle eficientes para o controle da doença pé-preto (ALANIZ et al., 2010).

No Brasil e no mundo, o uso de fungos do gênero *Trichoderma* Persoon como biocontrolador tem apresentado sucesso no controle de fitopatógenos de solo (CORABI-ADELL, 2004). São capazes de atuar no controle de doenças de várias plantas cultivadas, são promotores de crescimento e de tolerância ao estresse e indutores de resistência de plantas a doenças (HARMAN, 2000). Populações de bactérias do gênero *Bacillus* que são encontradas naturalmente no solo, também vêm sendo empregadas na agricultura com efeitos diretos na promoção de crescimento e/ou no biocontrole (HAMMAMI et al., 2009). Segundo Leelasuphakul et al. (2008), o antagonismo direto exercido contra fitopatógenos envolve mecanismos de antibiose, como a síntese de substâncias antimicrobianas, a competição por espaço e nutrientes e a síntese de compostos voláteis.

Fourie et al. (2001) realizaram testes em viveiros comerciais e verificaram que 42,9% menos colônias de "*Cylindrocarpon*" foram isoladas em tratamentos que receberam *Trichoderma*, o que indica que a aplicação de *Trichoderma* spp. pode resultar na produção de mudas com menores níveis de infecção do patógeno. Fu et al. (2010) isolaram estirpes de bactérias da rizosfera de ginseng (*Panax quinquefolius* L.) e verificaram sua ação sobre isolado de *Fusarium* cf. *incarnatum*, resultados mostraram que o isolado bacteriano B2-5 reduziu significativamente o desenvolvimento da doença podridão radicular nas raízes de ginseng com graus de eficácia de 70,0% controle e 55,8% para as concentrações de inóculo de 10^6 CFU / ml e 10^8 CFU / mL, respectivamente. Um isolado de *Bacillus subtilis*, obtido a partir da lesão de poda em videira com sintomas de *Eutypa dieback*, inibiu o crescimento micelial de *Eutypa lata* em 88% em meio de cultura e suprimiu a incidência do patógeno por 100% em feridas de poda (FERREIRA et al., 1991).

Até o momento, no Brasil não há medidas de controle eficientes disponíveis contra a doença pé-preto da videira. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de controle de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. *in vitro* e *in vivo* contra *Campylocarpon pseudofasciculare* em mudas de videira da cv. Bordô, enxertadas em Paulsen 1103.

MATERIAL E MÉTODOS

Mudas de videira

Mudas de videira com um ano de idade, cv. Bordô, enxertadas em Paulsen 1103, utilizadas na condução desse experimento foram compradas de viveiro comercial.

Isolados de *Campylocarpon pseudofasciculare*

Foram utilizados sete isolados do patógeno provenientes da micoteca do Laboratório de Fitopatologia Dr^a Eloci Minussi, localizado no Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), estando armazenados em meio de cultura SNA (spezieller nährstoffarmer agar). Esses isolados foram coletados de plantas sintomáticas (raízes e caule) em vinhedos da Serra Gaúcha (Tabela 1), nomeados e identificados (SANTOS, et al. 2012). No Laboratório de Fitopatologia foram realizados testes *in vitro* de pareamento de cultura e metabólitos voláteis, a fim de selecionar um dos isolados de *Campylocarpon pseudofasciculare* para realização do teste *in vivo*.

Tabela 1. Isolados de *Campylocarpon pseudofasciculare* utilizados nos experimentos.

Código do isolado	Cidade de coleta	Porta-enxerto/enxerto
Cy1 UFSM	Fagundes Varela	Bordô
Cy2 UFSM	Guaporé	VR 043-43/ Violeta
Cy14 UFSM	Farroupilha	Bordô
Cy17 UFSM	Nova Pádua	RR 10114/Isabel
Cy20 UFSM	Nova Roma do Sul	Isabel

Produtos Biológicos

Os testes (*in vitro*) foram realizados no Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria e os experimentos *in vivo* foram conduzidos em casa de vegetação. Foram testados oito produtos à base de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. (Tabela 2), obtidos com as empresas fabricantes.

Tabela 2. Produtos à base de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* ssp. testados nos experimentos.

Nome comercial	Espécie	Empresa	Formulação	Concentração UFC/mL
Trichodermil SC 1306	<i>Trichoderma</i> <i>harzianum</i>	Itaforte Bio Produtos Empresa	Suspensão concentrada	2x10 ⁹
Trichodel	<i>T. harzianum</i> , <i>T.</i> <i>viride/atroviride</i>	Caxiense de Controle Biológico Ltda	Suspensão concentrada	1x10 ⁹
Ecotrich	<i>T. harzianum</i>	Ballagro Agro Tecnologia	Pó molhável	1x10 ¹⁰
Effetive	<i>Trichoderma</i> sp.	Cema Agricultura Biológica	Suspensão concentrada	1x10 ⁹
Quality WG	<i>Trichoderma</i> <i>asperellum</i>	Grupo Farroupilha	Grânulos dispersíveis em água (WG)	1x10 ¹⁰
Rizos	<i>Bacillus subtilis</i>	Grupo Farroupilha	Suspensão concentrada	3x10 ⁹
Onix	<i>Bacillus</i> <i>methylotrophicus</i>	Grupo Farroupilha	Suspensão concentrada	1x10 ⁹
Serenade	<i>Bacillus subtilis</i> Linhagem QST 713	BASF	Suspensão concentrada	1x10 ⁹

Experimento de controle biológico *in vitro*

Pareamento de culturas

Para verificar a capacidade de antagonismo dos produtos de controle biológico sobre os sete isolados de *Campylocarpon pseudofasciculare* foi realizado o teste de pareamento de culturas, que consiste em confrontar o patógeno com os isolados dos produtos e verificar se os mesmos são capazes de controlar o crescimento do patógeno. Inicialmente alíquotas de 2 µL de suspensão dos produtos à base de *Trichoderma* spp. foram colocadas em placas de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose e ágar), dez dias antes da instalação do ensaio, para posterior retirada dos discos contendo micélio e esporos. Em uma placa de Petri contendo meio de cultura BDA, foi depositado um disco (a 0,5 cm da borda) com estruturas do patógeno (Tabela 1). Após 14 dias, foi depositado na extremidade oposta, um disco contendo micélio dos isolados de *Trichoderma* (Tabela 2).

Para avaliar o antagonismo de *Bacillus* spp., foi depositado um disco de micélio de 8 mm, com estruturas dos patógenos (Tabela 2), no centro de placas de Petri contendo meio de cultivo BDA e após quatro dias, foram adicionados em quatro sítios equidistantes (3cm) do meio da placa, alíquotas de 10µL de suspensão bacteriana (10^8 ufc mL⁻¹).

A testemunha foi composta por placas de Petri que receberam apenas discos de micélio com estruturas do patógeno. Todas as placas foram acomodadas em câmaras do tipo BOD, com temperatura de 25 °C ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. As avaliações ocorreram após sete dias, quando foram feitas as medições de colônias com auxílio de um paquímetro digital. Foram realizadas cinco repetições para cada tratamento. Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial, utilizou-se a fórmula de Erdogan e Benlioglu (2010): [(Tratamento - controle) / controle x 100].

Metabólitos voláteis

Para avaliar a capacidade dos agentes de biocontrole de inibirem o crescimento de *C. pseudofasciculare* através da produção de metabólitos voláteis, foram utilizadas duas

superfícies de placas de Petri de 90 mm de diâmetro fixadas uma a outra. Um disco de 8 mm contendo estruturas de *Trichoderma* spp. (obtidas a partir dos produtos) foi repicado para o centro de uma placa de Petri e para a outra placa, um disco contendo estruturas do patógeno, com as mesmas dimensões. Após um dia, foram retiradas as tampas das placas, fixadas uma a outra, e vedadas com filme PVC, para evitar o escape de metabólitos.

O método de estrias paralelas derivadas das suspensões bacterianas (MONTEIRO et al., 2013) foi utilizado nas placas com *Bacillus* spp. Esse método consiste em depositar em uma das placas um disco de micélio do patógeno e na outra placa foram feitos sulcos paralelos com as suspensões dos produtos, após um dia essas placas foram unidas e vedadas com filme PVC. O tratamento testemunha foi composto de placas de Petri contendo apenas discos com micélio do patógeno. As placas foram colocadas em câmaras de BOD com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. A avaliação ocorreu após 14 dias da repicagem do antagonista, determinando o tamanho médio das colônias do patógeno, medindo em dois sentidos perpendiculares com auxílio de um paquímetro digital. Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial do patógeno, utilizou-se a fórmula de Erdogan & Benlioglu (2010): $[(\text{Tratamento} - \text{controle}) / \text{controle} \times 100]$. Cinco placas por tratamento foram utilizadas como repetições.

Experimento de biocontrole *in vivo*

O experimento foi instalado em casa de vegetação climatizada. Sendo utilizados oito produtos comerciais (Tabela 1) à base de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp., para testar o controle de *Campylocarpon pseudofasciculare*, isolado Cy14UFSM, que foi selecionado a partir dos testes de controle biológico *in vitro*, em mudas de videiras da cv. Bordô, enxertadas em Paulsen 1103. O substrato empregado (80% do substrato comercial Mec Plant® com 20% de areia peneirada e esterilizada) foi misturado com cada produto separadamente, dez dias antes da instalação do experimento, na quantidade de 10^4 mL g⁻¹ de substrato, para que os agentes de controle biológico fossem capazes de colonizar o substrato, mantendo umidade constante, através de gotejamento automático, a fim de favorecer o processo. Foi preparada uma suspensão de esporos do patógeno, contendo 10^5 conídios mL⁻¹ e, após uma breve poda, as raízes das plantas foram imersas por uma hora nessa suspensão para permitir a infecção. As mudas foram transplantadas para sacos plásticos com 2 L de volume, contendo o substrato

tratado com os produtos. Um tratamento testemunha constou apenas do patógeno e outro não recebeu patógeno nem o antagonista. Após 30 dias da instalação do experimento, os tratamentos com os produtos biológicos receberam uma nova aplicação, na quantidade de 10^4 ufc mL⁻¹. O experimento foi instalado no delineamento inteiramente casualizado, sendo utilizadas 10 repetições por tratamento. A temperatura de 25 °C e irrigação por gotejamento (4x ao dia, aproximadamente 10 mL/Kg de substrato/dia) foram mantidas durante todo período de quatro meses.

Os seguintes parâmetros foram avaliados: comprimento de maior raiz (CR, cm), comprimento do ramo principal (CRP, cm), número de nós no ramo principal (NNRP), número total de nós (NTN), número total de ramos (NTR), peso seco de parte aérea (PPA, g), peso seco de raiz (PSR, g) e taxa de reisolamento do patógeno (RI, %). Os valores de comprimento foram medidos com auxílio de uma fita métrica. A massa seca foi obtida após secagem do material vegetal em estufa com ventilação forçada a 60 ± 2 °C, até atingir peso constante, e pesagem em balança digital de precisão. Dez fragmentos foram cortados da parte basal do tronco e banhados em hipoclorito de sódio 1%, álcool 70% e três vezes em água destilada e esterilizada, por um minuto em cada solução. Após secos, os fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo BDA, acrescido de 0,5 g de sulfato de estreptomicina L⁻¹ de meio. Após 14 dias de incubação das placas, a temperatura de 25 °C no escuro, foi calculada a taxa de reisolamento.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado nos ensaios foi inteiramente casualizado. Para os experimentos *in vitro* foi utilizado esquema bifatorial, Fator A (isolados do patógeno) x Fator D (isolados do antagonista obtidos dos produtos comerciais). Foi realizada análise estatística separada para *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. Para o experimento *in vivo* foi utilizado esquema unifatorial. A análise constou da análise de variância dos dados transformados por $\sqrt{(x + 0,5)}$ e, quando constatado efeito significativo, realizou-se comparação das médias através do teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Para as análises, utilizou-se o software SISVAR 5.3 (Sistema de Análise de Variância Para Dados Balanceados) (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Testes *in vitro*

Pareamento de culturas

No teste de cultivo pareado, verificou-se que houve interação entre os fatores A (isolados do patógeno) x Fator D (isolados dos antagonistas). Todos os tratamentos foram capazes de inibir, em relação à testemunha, o crescimento micelial de *Campylocarpon pseudofasciculare*, com médias inferiores a 50% entre os tratamentos (Tabela 3). Ensaios de cultivo pareado são frequentemente utilizados para a seleção de agentes de controle biológico (LOPES et al., 2012). Existem vários mecanismos utilizados por agentes de controle biológico que podem inibir o crescimento de patógenos, como a competição por nutrientes e espaço, micoparasitismo e antibiose (ALABOUVETTE et al., 2009).

Tabela 3. Inibição (%) do crescimento micelial de isolados de *Campylocarpon pseudofasciculare* em cultivo pareado com isolados de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. *in vitro*.

Inibição de crescimento de <i>C. pseudofasciculare</i>						
(%) ¹						
Tratamento ²	Cy1 UFSM	Cy2 UFSM	Cy14 UFSM	Cy17 UFSM	Cy20 UFSM	Média
T1	46,62 aA ^{3,4}	49,64 aA	34,46 cA	47,66 aA	44,03 bA	44,48 a
T2	46,06 aA	44,61 aB	30,31 cB	46,24 aA	41,54 bB	41,74 b
T3	41,59 bB	45,04 aB	28,64 cB	45,45 aA	44,94 aA	41,13 b
T4	34,65 aC	36,58 aC	26,87 bB	36,97 aB	37,61 aC	34,43 c
T5	46,51 aA	46,45 aB	34,02 bA	46,79 aA	47,03 aA	44,16 a
Média	43,07 B	44,47 A	30,86 C	44,62 A	43,03 B	
CV	6,28					
T6	51,48 aA	42,76 bB	41,47 bA	52,36 aA	52,79 aA	48,17 a
T7	45,85 bB	37,94 cB	36,55 cB	47,42 bB	51,57 aA	43,86 c
T8	49,06 aA	40,22 bA	38,26 bB	50,04 aA	52,34 aA	45,98 b
Média	48,79 B	40,30 C	38,76 C	49,94 B	52,23 A	
CV	5,04					

¹Foi realizada análise estatística separada para *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp.

²Tratamento: T1: Trichodermil SC 1306® (*T. harzianum*); T2: Trichodel® (*T. harzianum*, *T. viride/atroviride*, *T. viride*); T3: Ecotrich® (*T. harzianum*); T4 Effetive® (*Trichoderma* spp.) T5: Quality WG® (*Trichoderma asperellum*); T6: Rizos® (*Bacillus subtilis*); T7: Onix® (*Bacillus methylotrophicus*); T8: Serenade® (*Bacillus subtilis* Linhagem QST 713).

³ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

⁴Dados transformados ($\sqrt{(x + 0,5)}$).

Os tratamentos T1 (*Trichoderma harzianum*) e T5 (*Trichoderma asperellum*) reduziram o crescimento micelial do patógeno em 44,48 e 44,16%, respectivamente, e diferiram estatisticamente dos demais tratamentos. Qualhato et al. (2013) realizaram teste de pareamento de culturas com isolados de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma asperellum* e verificaram que inibiram o crescimento micelial de três agentes patogênicos (*Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Rhizoctonia solani* J. G. Kühn e *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary), recebendo nota 2 (*Trichoderma* spp. ocupa 75% da placa) de acordo com a escala de Bell et

al. (1982). Neste trabalho, o maior controle foi observado para os isolados Cy2 UFSM e Cy17 UFSM, que apresentaram 44,47% e 44,62% de redução do crescimento, diferindo dos demais isolados. O menor controle foi observado para o isolado Cy14 UFSM, com 30,86% de redução micelial.

No ensaio avaliando *Bacillus* spp., os três tratamentos diferiram estatisticamente entre si, na média, com o tratamento T6 (*Bacillus subtilis*) apresentando a maior inibição de crescimento (48,17%). O melhor controle foi verificado para o isolado Cy20 UFSM com 52,23% de proteção. Ashwini e Srividya (2013), testando a ação de *B. subtilis* contra isolado de *Fusarium oxysporum* Schltdl. e *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., em cultivo pareado, verificaram redução micelial de 40 e 41%, respectivamente. Em ensaio *in vitro*, *Bacillus subtilis* foi testado para controle de *Rhizoctonia solani* J. G. Kühn em cultivo pareado, apresentando percentual médio de inibição de 50% (SEEMA e DEVAKI, 2012). Vários são os mecanismos utilizados por microrganismos para inibir o crescimento de outros como a competição por carbono, nitrogênio, espaço ou sítios específicos de infecção (Vinale et al., 2008).

Metabólitos voláteis

No teste *in vitro* com metabólitos voláteis, todos os tratamentos com isolados de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. inibiram o crescimento de *Campylocarpon pseudofasciculare* através da produção de metabólitos voláteis (Tabela 4). No ensaio utilizando *Trichoderma* spp. no controle do patógeno, ocorreu interação significativa entre fatores. A redução de crescimento micelial foi superior a 50% para todos os tratamentos, indicando que podem controlar o crescimento do patógeno. De acordo com Wheatley (2002), compostos orgânicos voláteis são moléculas que geralmente têm baixo peso molecular e pressão de vapor elevada e, por isso, podem ser espalhados por longas distâncias no ambiente, sem necessitar de contato direto.

Tabela 4. Inibição (%) de crescimento micelial de isolados de *Campylocarpon pseudofasciculare* expostos a metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. *in vitro*.

Inibição de crescimento de <i>C. pseudofasciculare</i>						
(%) ¹						
Tratamento ²	Cy1 UFSM	Cy2 UFSM	Cy14 UFSM	Cy17 UFSM	Cy20 UFSM	Média
T1	69,18 aA ^{3,4}	69,40 aA	65,67 bA	66,60 bA	50,63 cC	64,29 b
T2	65,39 aB	67,40 aA	54,31 bB	68,30 aA	64,12 aA	63,90 b
T3	44,00 cC	45,25 cB	49,28 bC	69,68 aA	46,17 cD	50,87 c
T4	65,37 bB	67,40 bA	45,99 dC	70,44 aA	56,36 cB	61,11 b
T5	62,33 cB	69,90 aA	65,04 bA	73,37 aA	66,80 bA	67,49 a
Média	61,25 B	63,87 B	56,06 C	69,68 A	56,81 C	
CV	4,44					
T6	35,12 cA	45,57 bA	33,61 cA	55,46 aA	44,07 bB	42,77 b
T7	35,88 cA	48,71 bA	33,90 cA	54,05 aA	57,35 aA	45,98 a
T8	35,05 cA	46,58 bA	35,87 cA	54,50 aA	58,17 aA	46,03 a
Média	35,35 C	46,95 B	34,46 C	54,67 A	53,20 A	
CV	6,54					

¹Foi realizada análise estatística separada para *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp.

²Tratamento: T1: Trichodermil SC 1306® (*T. harzianum*); T2: Trichodel® (*T. harzianum*, *T. viride/atroviride*, *T. viride*); T3: Ecotrich® (*T. harzianum*); T4 Effetive® (*Trichoderma* spp.) T5: Quality WG® (*Trichoderma asperellum*); T6: Rizos® (*Bacillus subtilis*); T7: Onix® (*Bacillus methylotrophicus*); T8: Serenade® (*Bacillus subtilis* Linhagem QST 713).

³ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

⁴Dados transformados ($\sqrt{(x + 0,5)}$).

O tratamento T5 (*Trichoderma asperellum*) reduziu em 67,44% o crescimento micelial do patógeno, sendo a maior média e diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Em seguida aparecem os tratamentos T1 (*Trichoderma harzianum*), T2 (*T. harzianum*, *T. viride/atroviride*, *T. viride*) e T4 (*Trichoderma* spp.) que conferiram respectivamente 64,29, 63,90 e 61,11% de redução micelial a *Campylocarpon pseudofasciculare*, não diferindo estatisticamente entre si. Em trabalho realizado por Sharfuddin e Mohanka (2012), testando isolados nativos de *Trichoderma* contra *Fusarium oxysporum* Schlecht emend. Snyder and

Hansen f. sp. *lentis* Vasudeva and Srinivasan, os valores de redução micelial obtidos foram de 82,8% para *T. harzianum*, 82,3% para *T. koningii*, 79,2% para *T. viride*, classificando essas espécies como controladoras do patógeno em condições *in vitro*.

Para tratamentos à base de *Bacillus* spp., os valores médios de redução micelial dos patógenos foram inferiores aos tratamentos com *Trichoderma* spp. Resultados com as melhores médias foram verificados para os tratamentos T7 (*Bacillus methylophilus*), com redução de 46,03%, e T8 (*Bacillus subtilis* Linhagem QST 713), que reduziu em 45,98% o crescimento micelial do patógeno. Ambos diferiram estatisticamente de T6 (*Bacillus subtilis*) que apresentou redução de 42,77%. O maior controle foi observado para os isolados Cy17 UFSM (54,67%) e Cy20 UFSM (53,20%). Nourozian et al. (2006) verificaram correlação positiva entre a produção de metabólitos voláteis e a capacidade antagônica de diferentes estirpes de *Bacillus subtilis* contra isolado de *Fusarium graminearum* Schwabe, com a percentagem de redução do crescimento variando de 51 a 89%, resultado superior ao encontrado neste trabalho. Ensaio *in vitro* mostraram que metabólitos secretados por *Bacillus subtilis* AG1 podem inibir o crescimento de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., agente causal das podridões de tronco e raízes da videira (ALFONZO et al., 2009). O antagonismo exercido por *Bacillus subtilis* contra fitopatógenos envolve mecanismos de antibiose, como a síntese de substâncias antimicrobianas, a competição por espaço e nutrientes e a síntese de compostos voláteis (LEELASUPHAKUL et al., 2008).

Teste *in vivo*

No experimento de controle biológico *in vivo* foi verificado que todos os tratamentos, exceto a testemunha absoluta que recebeu apenas a adição de água, apresentavam algum grau de manifestação da doença pé-preto (Figura 2). Nas raízes, era possível a visualização de algumas lesões necróticas e redução da massa de raízes. A severidade nas plantas que foram tratadas com os produtos à base de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. era inferior, comparados às plantas que receberam apenas o patógeno. Não foi possível fazer a quantificação dos dados relacionados aos danos nas raízes e parte basal do caule, sendo feita somente a quantificação de dados relacionados ao vigor da planta.

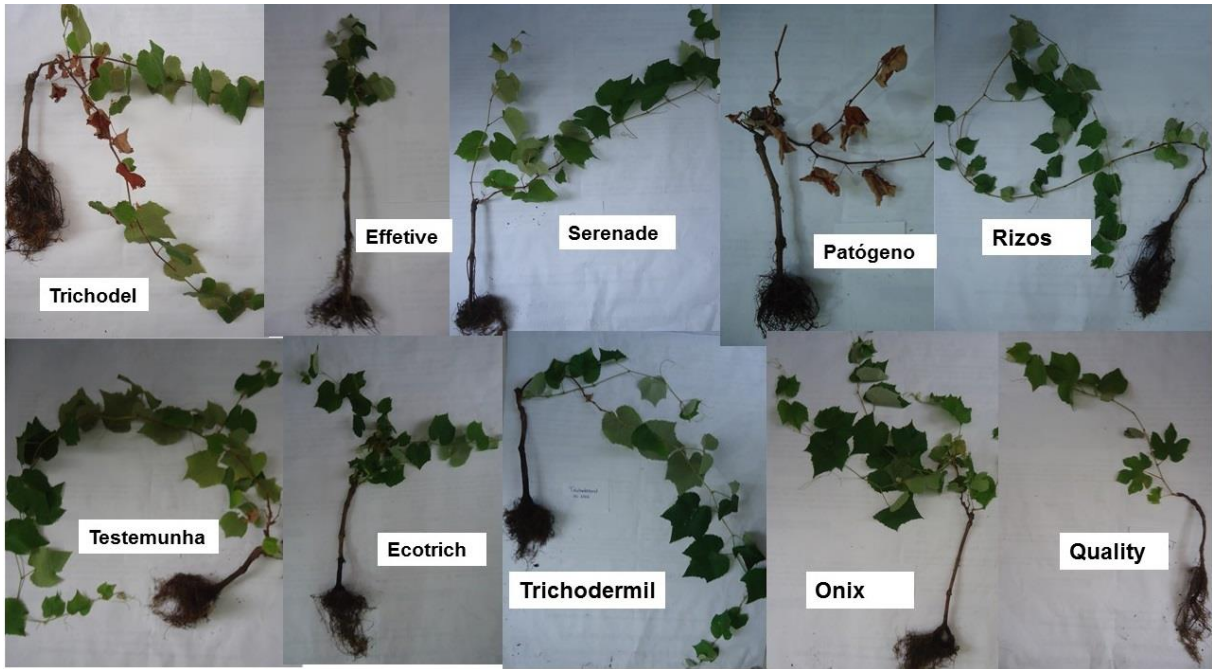


Figura 2 Efeito dos dez tratamentos no desenvolvimento de plantas de videira inoculadas com *Campylocarpon pseudofasciculare*.

Tabela 5. Efeito de diferentes produtos de controle biológico no comprimento da maior raiz formada (CR, cm), comprimento do ramo principal (CRP, cm), número de nós no ramo principal (NNRP), número total de nós (NTN), número total de ramos (NTR), peso seco de parte aérea (PSPA, g), peso seco de raiz (PSR, g) e taxa de reisolamento do patógeno (RI, %) em videiras cv. Bordô inoculadas com *Campylocarpon pseudofasciculare*.

Trat. ¹	CR	CRP	NNRP	NTN	NTR	PSPA	PSR	RI
T1	28,90 a ²	96,00 a	21,10 a	29,40 a	2,30 a	28,38 a	16,87 a	58,40 b
T2	30,50 a	90,30 a	19,00 a	25,60 a	2,40 a	27,85 a	12,61 c	59,59 b
T3	29,80 a	95,40 a	20,30 a	28,00 a	2,20 a	24,13 a	12,46 c	64,72 b
T4	22,70 b	77,30 b	16,20 b	22,00 b	1,90 a	19,86 b	9,21 d	58,95 b
T5	28,70 a	92,40 a	14,90 b	21,90 b	2,30 a	25,01 a	14,76 b	55,64 b
T6	33,10 a	101,40 a	18,60 a	27,60 a	2,10 a	26,93 a	11,54 c	58,88 b
T7	28,20 a	90,90 a	18,40 a	25,90 a	1,90 a	27,95 a	14,58 b	59,66 b
T8	30,90 a	90,80 a	17,90 a	25,20 a	2,10 a	31,87 a	14,96 b	60,00 b
T9	23,10 b	56,00 c	15,40 b	19,80 b	1,80 a	14,48 c	8,26 d	75,62 a
T10	33,40 a	94,80 a	19,80 a	25,50 a	2,10 a	38,25 a	18,47 a	0,00 c
CV %	18,41	15,01	26,45	25,88	27,50	20,04	19,50	13,95

¹Tratamento: T1: Trichodermil SC 1306® (*T. harzianum*); T2: Trichodel® (*T. harzianum*, *T. viride/atroviride*, *T. viride*); T3: Ecotrich® (*T. harzianum*); T4 Effetive® (*Trichoderma* spp.) T5: Quality WG® (*Trichoderma asperellum*); T6: Rizos® (*Bacillus subtilis*); T7: Onix® (*Bacillus methylotrophicus*); T8: Serenade® (*Bacillus subtilis* Linhagem QST 713).

² Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Em todas as variáveis analisadas, o tratamento T9 (inoculado somente com o patógeno) apresentou médias inferiores as demais (Tabela 5) e a severidade da doença nas plantas era mais intensa. Isolados de “*Cylindrocarpon*”, coletados em vinhedos da Serra Gaúcha e inoculados em mudas da cultivar Bordô, mostraram sintomas típicos da doença, como redução do vigor e número de brotações, murchamento da parte aérea, escurecimento do colo da planta e sistema radicular (GARRIDO et al., 2004).

É possível verificar, através dos parâmetros medidos, que os produtos à base de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. são capazes de conferir proteção contra a doença, mostrando médias superiores ao tratamento testemunha, que recebeu apenas o patógeno. No parâmetro comprimento de maior raiz (CR), as maiores médias foram encontradas no tratamento T10

(testemunha absoluta) que não recebeu o patógeno, T6 e T8, que são os produtos à base de *Bacillus subtilis*. Maciel et al. (2014) em trabalho realizado em viveiro, inoculando sementes de *Pinus elliottii* Engelm com *Fusarium sambucinum* e em seguida com bioprotetores, verificou acréscimo no comprimento de raízes de *P. elliottii*, de 7,94 cm (testemunha) para 11,78 cm (sementes inoculadas com *F. sambucinum* e tratadas com *B. subtilis*). Entre as vantagens de se utilizar agentes de biocontrole, a exposição de *B. subtilis* em plantas pode ocasionar a promoção de crescimento e/ou o biocontrole (HAMMAMI et al., 2009), através de diversos mecanismos de ação.

O comprimento do ramo principal (CRP) teve seu pior resultado no T9 (tratamento inoculado somente com o patógeno), que diferiu estatisticamente dos demais tratamentos, reduzindo o desenvolvimento de parte aérea da planta, seguido do T4, produto a base de espécies de *Trichoderma*. A maior média é verificada no T6 (*Bacillus subtilis*), porém não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos. Sossai et al. (2011), avaliando efeitos de tratamentos químicos e biológicos sobre alface, obtiveram um aumento de 33,33% em peso da parte aérea, quando as plantas foram tratadas com *Bacillus subtilis*. A promoção de crescimento ocasionada por *B. subtilis* é uma das consequências da utilização desse agente de biocontrole e ocorre devido ao aumento da fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes, síntese de fitormônios e melhoria das condições do solo (LANNA et al., 2010). Na avaliação do número de nós do ramo principal (NNRP) e número total de nós (NTN), foram encontrados resultados semelhantes, com os menores valores encontrados para T9 (somente patógeno), T4 (*Trichoderma* spp.) e T5 (*T. asperellum*), que diferiram estatisticamente dos demais tratamentos. Para o número total de ramos (NTR) não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Para as variáveis peso seco de parte aérea (PSPA) e peso seco de raiz (PSR), houve diminuição em plantas que receberam *Campylocarpon pseudofasciculare* mesmo com a adição dos bioprotetores. As maiores médias para ambos parâmetros, foram verificadas para o tratamento testemunha absoluta (T10), com 38,25 g para PSPA e 18,47 g para PSR. O PSPA foi menor no tratamento T9 (tratamento testemunha somente com patógeno) com 14,48 g, seguido de T4 (*Trichoderma* spp.) com 19,86 g, que diferiram estatisticamente entre si e dos demais tratamentos. Maciel et al. (2014) de *Pinus* observaram ganho de massa seca em *P. elliottii* de 0,26 g em relação ao tratamento testemunha que não recebeu o patógeno, em tratamento utilizando *B. subtilis* no controle de *Fusarium sambucinum*. Para PSR, o tratamento T1 (*Trichoderma harzianum*) obteve a maior média depois do tratamento testemunha absoluta.

O reisolamento do patógeno foi de 0% em T10, tratamento que não recebeu o patógeno, e maior em T9 (75,62%), tratamento somente com o patógeno. O tratamento T5 (*T. asperellum*) foi capaz de reduzir em cerca de 20 % a taxa de reisolamento do patógeno quando comparado com o tratamento testemunha. Fourie et al. (2001) obtiveram menores porcentagens de isolamento de “*Cylindrocarpon*” em tratamentos que receberam *Trichoderma*. Essas plantas tiveram níveis de infecção inferiores ao tratamento que recebeu apenas os patógenos, o que indica que a aplicação desse biocontrolador pode resultar na produção de mudas mais fortes e com menores danos do patógeno.

REFERÊNCIAS

- ALANIZ, S. LEON, M.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ABAD, P.; ARMENGOL, J. Susceptibility of grapevine rootstocks to *Cylindrocarpon liriodendri* and *C. macrodidymum*. **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 3, p. 305-308, 2010.
- ALFONZO, A. et al. Antagonism of *Bacillus subtilis* strain AG1 against vine wood fungal pathogens. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 48, n. 1, p. 155-158, 2009.
- ALABOUVETTE, C. et al. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. **New Phytologist**, v. 184, p. 529-544, 2009.
- ASHWINI, N.; SRIVIDYA, S. Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. 3 **Biotech**, v. 1, p. 10, 2013.
- CABRAL, A. C. G. P. **New insights in *Ilyonectria* black foot disease of grapevine**. 2011. 252 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agronomica)- Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.
- CAMARGO, U. A. Classificação botânica. In: LEÃO, P. C. S. **Uva de Mesa: Produção – Aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, cap. 2, 2001. p. 12-13.
- CARVALHO, D. D. C. et al. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. **Tropical Plant Pathology** v. 39, p. 384-381, 2014.
- CHAVERRI, P. et al. Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. **Studies in Mycology**, v. 68, n. 1, p. 57-78, 2011.
- CORABI-ADELL, C. **Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (HYPOCREALES-FUNGI) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica**. 2004. 220 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de São Paulo, Rio Claro, 2004.
- ERDOGAN, O.; BENLIOGLU, K. Biological control of Verticillium wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. under field conditions. **Biological Control**, v. 53, p. 39-45, 2010.

FERREIRA J. H. S., F. N. MATTHEE; A. C. THOMAS, Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**, v. 81, p. 283–287, 1991.

FERREIRA, D. F. 2010. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Disponível em: <<http://faostat.fao.org/default.aspx>>. Acesso em: 15.10.2014.

FOURIE, P. H. et al. Effect of *Trichoderma* treatments on the occurrence of decline pathogens in the roots and rootstocks of nursery grapevines. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 40, p. 473-78, 2001.

FU, J. F. et al. Isolation screening and identification of antagonistic bacteria against *Ginseng rusted* root disease. **Journal of Jilin Agricultural University**, v. 32, n. 3, p. 136-139, 2010.

GARRIDO, L. D. R.; SÔNEGO, O. R.; URBEN, A. F. *Cylindrocarpon destructans* causador do “Pé-Preto” da videira no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 548-550, 2004.

HAMMAMI, I. et al. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 253-260, 2009.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v. 84, p. 377-393, 2000.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C.; Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 13, 2010.

LEELASUPHAKUL, W. et al. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p. 113-121, 2008.

LOPES, F.A.C. et al. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biologia fúngica**, v. 116, p. 815-824, 2012.

MACIEL, C. G. et al. Antagonismo de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* (UFV3918) a *Fusarium sambucinum* em *Pinus elliottii* Engelm. **Revista Árvore**, v. 38, n. 3, p. 505-512, 2014.

NOUROZIAN, J.; ETEBARIAN, H. R.; KHODAKARAMIAN, G. Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat. **Songklanakarin Journal Science and Technology**, v. 28, p. 29-38, 2006.

POMMER, C. V. **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003.

QUALHATO, T. F. et al. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. **Biotechnological Letters**, v. 35, p. 1461-1468, 2013.

SEEMA, M.; DEVAKY, N. S. *In vitro* evaluation of biological control agents against *Rhizoctonia solani*. **Journal of Agricultural Technology**, v. 8, p. 233-240, 2012.

SEIFERT, K. A. et al. Molecular differentiation and detection of ginseng-adapted isolates of the root rot fungus *Cylindrocarpon destructans*. **Phytopathology**, v. 95, p. 1533-1542, 2003.

SHARFUDDIN, C; MOHANKA, R. *In vitro* antagonism of indigenous *Trichoderma* isolates against phytopathogen causing wilt of lentil. **International Journal of Life Science e Pharma Research**, v. 2, p. 195-202, 2012.

SOSSAI, B. F. et al. Efeito de tratamentos químicos e biológicos sobre o crescimento da alface. **Colloquium Agrariae**, v. 1, p. 188, 2011.

VINALE, F. et al. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 1-10, 2008.

WHEATLEY, R. E. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 357-364, 2002.

CAPÍTULO 2

REAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS A *Campylocarpon pseudofasciculare* e *Ilyonectria macrodidyma*

INTRODUÇÃO

A videira se apresenta economicamente como uma das mais importantes plantas frutíferas cultivadas em todo mundo, devendo-se às inúmeras utilizações dos seus frutos para consumo *in natura* e processamento, na fabricação de vinhos, sucos e derivados (POMMER; MAIA, 2003). O cultivo de uvas para vinho e seus subprodutos ocorre, em maior concentração, no Rio Grande do Sul, onde são elaborados, em média, 330 milhões de litros de vinhos e mostos, o que representa 95% da produção nacional (PROTAS et al., 2008). A qualidade da uva e, conseqüentemente, do vinho são resultados da interação de aspectos biológicos, físicos, climáticos, sanitários e culturais (SILVA et al., 2008).

O emprego de porta-enxerto é uma prática muito comum e utilizada na viticultura no mundo todo. Inicialmente, foram introduzidos como forma de resistência ao ataque da filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch, 1854). Hoje, prima-se pelas características que a interação porta-enxerto/cultivar transmite à copa e, conseqüentemente, à uva e ao vinho (MIELE et al., 2009). A utilização de porta-enxertos ocorre a fim de garantir a adaptação da variedade de videira a ser cultivada, condições de clima, diferentes tipos de solo, controle de pragas e moléstias de solo (PINKERTON et al., 2005).

Os fungos associados a doenças do tronco da videira são considerados os patógenos mais destruidores de material de propagação de videiras ou de vinhedos jovens (GRAMAJE; ARMENGOL, 2011). A doença pé-preto tem a maioria dos seus sintomas causados no porta-enxerto. Na região do colo da planta, observa-se completo escurecimento interno, de coloração marrom escura a preta (GARRIDO et al., 2004). O material de propagação

vegetativa é um importante transporte de disseminação dos patógenos responsáveis pelo declínio de videiras jovens (GUBLER et al., 2004; REGO et al., 2001), com a entrada do patógeno na planta dando-se pelas raízes do porta-enxerto ou pelo corte na região de enxertia.

Segundo Raserá (2005), o porta-enxerto VR 043-43 apresentou extrema suscetibilidade à “*Cylindrocarpon*” *destructans*, morrendo em pouco tempo depois de transplantado em solos infestados com esse patógeno. Alaniz et al. (2010) verificaram a resistência de diversos porta-enxertos na Espanha, mostrando a manifestação da doença em diferentes níveis nos materiais avaliados. “*Cylindrocarpon*” *pauciseptatum* Schroers e Crous foi inoculado em porta-enxerto 110R, o qual se mostrou muito suscetível ao patógeno. Porém, Gubler et al. (2004) verificaram que os porta-enxertos *Vitis riparia* Mchx “039-16” e Freedom apresentavam um bom grau de resistência a “*C.*” *destructans*.

Até o momento, não há medidas de controle eficientes disponíveis contra a doença pé-preto da videira. A utilização de material de plantio (porta-enxertos/enxertos-prontos) com resistência à doença pode contribuir para o controle. Assim, esse estudo objetivou avaliar a ocorrência de resistência dos porta-enxertos contra *Campylocarpon pseudofasciculare* e *Ilyonectria macrodidyma*.

MATERIAL E MÉTODOS

Mudas de porta-enxertos

As mudas de porta-enxertos (Tabela 1) utilizadas na realização desse ensaio foram doadas pela EMBRAPA Uva e Vinho, de Bento Gonçalves. Os porta-enxertos 101-14, Solferino, 420 A, 161-49, SO4, IAC 766 e P1103 foram selecionados do Banco Ativo de Germoplasma e enraizadas em casa de vegetação por quatro meses. As mudas, no momento do plantio estavam com raiz nua.

Tabela 1 Porta-enxertos de videira utilizados na condução do experimento de resistência a *Campylocarpon pseudofasciculare* e *Ilyonectria macrodidyma*.

Porta-enxertos	Material de cruzamento
101-14	<i>Vitis riparia</i> x <i>Vitis rupestris</i>
Solferino	<i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis riparia</i>
420 A	<i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis riparia</i>
161-49	<i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis riparia</i>
SO4	<i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis riparia</i>
IAC 766	106-8 x <i>Vitis tiliifolia</i>
P1103	<i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis rupestris</i>

Isolados de *Ilyonectria macrodidyma* e *Campylocarpon pseudofasciculare*

Os isolados de *Ilyonectria macrodidyma* (Cy15UFSM) e *Campylocarpon pseudofasciculare* (Cy14UFSM) foram obtidos da micoteca do Laboratório de Fitopatologia Dr^a Eloci Minussi, localizado no Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), estando armazenados em meio de cultura SNA. Esses isolados foram coletados de plantas sintomáticas (raízes e caule) em vinhedos da Serra Gaúcha, nomeados e identificados (SANTOS et al., 2012).

Experimento reação de porta-enxertos a *Ilyonectria macrodidyma* e *Campylocarpon pseudofasciculare*

Para o teste de reação dos porta-enxertos, os isolados de *Ilyonectria macrodidyma* e *Campylocarpon pseudofasciculare* foram cultivados em BDA e incubados a 25 °C no escuro, durante 30 dias antes da inoculação. O inóculo foi preparado por raspagem superficial da colônia com auxílio de uma alça de Drigalski, após a adição de 10 ml de água destilada e

esterilizada em cada placa. A suspensão obtida foi filtrada através de duas camadas de gaze e ajustada a 10^6 conídios mL^{-1} com água destilada esterilizada usando uma câmara de Neubauer. Foram utilizadas mudas enraizadas de porta-enxertos (Tabela 4) com quatro meses de idade, sendo as raízes podadas até 15 cm, usando uma tesoura estéril. As raízes foram mergulhadas na suspensão de cada isolado durante 60 minutos, com um total de dez plantas por isolado. Após a inoculação, as plantas foram transplantadas para sacos de plástico com capacidade para 2 L de volume, contendo substrato (80% de substrato comercial Mec Plant® e 20% de areia) e mantidas em estufa a 25 ± 2 °C com irrigação diária. Após um mês, as plantas foram reinoculadas usando 40 ml de suspensão (10^6 conídios mL^{-1}) por planta para garantir a infecção da raiz. O tratamento testemunha recebeu apenas água destilada estéril na inoculação e na reinoculação. Quatro meses após o início do experimento, as raízes das plantas foram lavadas com água corrente para eliminar o substrato e os sintomas foram avaliados. Uma escala de classificação 0 a 5 foi utilizada: 0 = planta saudável (tratamento testemunha); 1 = 0 a 20% de redução da massa foliar; 2 = 20 a 40% de redução da massa foliar; 3 = 40 a 60% de redução da massa foliar; 4 = 60 a 80% de redução da massa foliar; 5 = redução da massa foliar em mais de 80%, secagem da muda ou morte da planta.

Os sintomas da raiz de cada planta foram avaliados de acordo com uma escala adaptada de Alaniz et al. (2007), na qual: 0 = planta saudável sem lesões necróticas; 1 = 0 a 10% de redução da massa de raiz; 2 = 10 a 25% de redução da massa de raiz; 3 = 25 a 50% de redução da massa de raiz; 4 = redução da massa de raiz em mais de 50%, e 5 = morte da planta. Massa seca da parte aérea e massa seca das raízes foram determinadas após a secagem do material em estufa de secagem de ar forçado a 60 ± 2 °C até peso constante. Para o isolamento do patógeno, 10 fragmentos de tecido da região basal de cada planta foram desinfetados superficialmente com imersão, por um minuto, em álcool 70%, hipoclorito de sódio 1% e água destilada esterilizada por três vezes. Os fragmentos foram secos sobre papel de filtro estéril e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA adicionado de 0,5 g de sulfato de estreptomicina por litro. As placas foram incubadas a 20 ± 2 °C durante 14 dias no escuro. Após esse período, foi calculada a proporção de fragmentos de tecido dos quais colônias de *Campylocarpon pseudofasciculare* e *Ilyonectria macrodidyma* foram recuperadas em relação ao total de fragmentos.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado nos ensaios foi inteiramente casualizado no esquema bifatorial, Fator A (isolados do patógeno) x Fator D (porta-enxertos). A análise constou da análise de variância dos dados transformados por $\sqrt{(x + 0,5)}$ e, quando constatado efeito significativo, realizou-se comparação das médias através do teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Para as análises, utilizou-se o software SISVAR 5.3 (Sistema de Análise de Variância Para Dados Balanceados) (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após os quatro meses em casa de vegetação, as plantas inoculadas com *Campylocarpon pseudofasciculare* e *Ilyonectria macrodidyma* apresentaram uma redução de massa de raízes (Tabela 2), necrose do caule e raízes, redução de massa e morte da parte aérea (Tabela 3), e posterior morte das plantas (Figura 3). Garrido et al. (2004) observaram sintomas como escurecimento na região do colo, redução do vigor, secamento da parte aérea, declínio e morte em videiras cv. Bordô quando inoculadas com "*Cylindrocarpon*" *destructans*. Neste trabalho foram encontrados sintomas semelhantes.

Tabela 2 Severidade em raízes, observados no teste de resistência de porta-enxertos de videira a *Campylocarpon pseudofasciculare* (Cy14UFSM) e *Ilyonectria macrodidyma* (Cy15UFSM).

Porta-enxertos/ Isolados	101-14	Solferino	420 A	161-49	SO4	IAC 766	P1103
Cy14UFSM	4,4 bA ^{1,2}	3,3 bB	4,0 bA	3,1 bB	4,4 bA	3,1 bB	3,8 bA
Cy15UFSM	4,7 bA	3,4 bB	4,6 bA	3,3 bB	4,6 bA	3,6 bB	4,7 bA
Testemunha	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA
CV %	22,14						

¹ Sintomas nas raízes avaliados utilizando escala: 0 = planta saudável sem lesões necróticas; 1 = 0 a 10% de redução da massa de raiz; 2 = 10 a 25% de redução da massa de raiz; 3 = 25 a 50% de redução da massa de raiz; 4 = redução da massa de raiz em mais de 50%, e 5 = morte da planta. Adaptado de Alaniz et al., (2007).

² Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e na minúscula linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Houve interação entre os fatores fator A (isolados de patógenos) x Fator D (porta-enxertos), para sintomas de parte aérea e raiz e todos os isolados avaliados mostraram-se patogênicos aos porta-enxertos avaliados. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Jaspers et al. (2007) que demonstraram que porta-enxertos mais comumente encontrados na Nova Zelândia são suscetíveis a “*Cylindrocarpon*” spp. em algum nível de severidade, quando inoculados em casa de vegetação. Também em casa de vegetação, sete porta-enxertos inoculados com “*Cylindrocarpon*” *liriodendri* JD MacDonald e EE Butler e “*Cylindrocarpon*” *macrodidymun* Schoers, Halleen e Crous foram afetados em algum grau pelos patógenos (ALANIZ et al., 2010). Os autores encontraram diferença significativa nas notas atribuídas aos sintomas de parte aérea e raízes em plantas com e sem a inoculação dos patógenos, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

Não ocorreu diferença estatística entre os isolados, relativo as notas atribuídas para o sistema radicular. Apenas as plantas controle diferiram, pois não apresentavam nenhum sintoma. Os valores médios conferidos aos sintomas do sistema radicular variaram de 3,1 (Cy14UFSM) a 4,7(Cy15UFSM). Resultados semelhantes foram encontrados por Santos et al. (2015), onde valores atribuídos aos sintomas do sistema radicular variaram de 2,6 para isolado de *Ilyonectria robusta* (A.A. Hildebr.) A. Cabral e Crous a 4,8 para isolado de *Ilyonectria macrodidyma*.

Através da interação, verifica-se que ocorre diferença estatística no grau de agressividade dos patógenos entre os porta-enxertos. 101-14, 420 A, SO4 e P-1103 obtiveram

notas superiores aos demais porta-enxertos nos sintomas de parte aérea e raízes, indicando que têm um grau de suscetibilidade maior aos isolados testados neste estudo. Rahman e Punja (2005) verificaram que os isolados altamente virulentos de "*Cylindrocarpon*" *destructans*, obtidos a partir de ginseng (*Panax quinquefolius* L.), produziram níveis mais elevados de enzimas (pectinase e polifenoloxidase), se comparado com os isolados menos virulentos.

Tabela 3 Severidade em parte aérea, observados no teste de reação de porta-enxertos de videira aos patógenos *Campylocarpon pseudofasciculare* (Cy14UFSM) e *Ilyonectria macrodidyma* (Cy15UFSM).

Porta-enxertos/ Isolados	101-14	Solferino	420 A	161-49	SO4	IAC 766	P1103
Cy14UFSM	3,3 bA ^{1,2}	2,6 bB	2,8 bB	2,6 bB	3,3 bA	2,4 bB	2,7 bB
Cy15UFSM	3,7 bA	2,7 bB	3,4 bA	2,4 bB	3,5 bA	2,5 bB	3,5 bA
Testemunha	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA
CV %	26,80						

¹ Sintomas na parte aérea avaliados utilizando a escala 0 = planta saudável (tratamento testemunha); 1 = 0 a 20% de redução da massa foliar; 2 = 20 a 40% de redução da massa foliar; 3 = 40 a 60% de redução da massa foliar; 4 = 60 a 80% de redução da massa foliar; 5 = redução da massa foliar em mais de 80%, secagem da muda ou morte da planta.

² Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e na minúscula linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

No tratamento controle, o reisolamento do patógeno (Tabela 4) foi de 0%, sendo superiores a 42% para os isolados fúngicos. A maior percentagem de reisolamento do patógeno foi observada com isolado Cy14UFSM no porta-enxerto 420 A (62%), que não diferiu estatisticamente dos demais. Santos et al. (2015) encontraram resultados semelhantes, onde a taxa de reisolamento do patógeno, foi superior a 45%, em mudas de *Vitis labrusca* cv. Bordô inoculadas com *Ilyonectria robusta*, *Ilyonectria macrodidyma* e "*Cylindrocarpon*" *pauciseptatum*.

Tabela 4 % de reisolamento obtida no teste de reação de porta-enxertos de videira aos patógenos *Campylocarpon pseudofasciculare* (Cy14UFSM) e *Ilyonectria macrodidyma* (Cy15UFSM).

Tratamentos	% de reisolamento
Cy14UFSM	53,5 b ¹
Cy15UFSM	51 b
Testemunha	0,0 a
CV %	25,67

¹ Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que todos os porta-enxertos foram afetados pelos patógenos, não havendo resposta dos mesmos aos patógenos *Campylocarpon pseudofasciculare* e *Ilyonectria macrodidyma*, testados neste experimento. Resultados semelhantes foram encontrados por Alaniz et al. (2010), que testaram a suscetibilidade de sete porta-enxertos (110R, P1103, 140-R, 161-49C, 196-17C, Fercal e SO4) a espécies de “*Cylindrocarpon*” e verificaram que todos porta-enxertos foram afetados em algum grau pelos patógenos.



Figura 3. Sintomas em porta-enxertos após teste de patogenicidade. **A)** planta morta, tratada com Cy15UFSM; **B)** planta controle, sem sintomas em parte aérea; **C)** necrose interna do caule; **D)** planta controle, sistema radicular volumosos; **E)** planta tratada com Cy15UFS.

REFERÊNCIAS

- ALANIZ, S. LEON, M.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ABAD, P.; ARMENGOL, J. Characterization of *Cylindrocarpon* species associated with black-foot disease of grapevine in Spain. **Plant Disease**, v. 91, p. 1187-1193, 2007.
- ALANIZ, S. LEON, M.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ABAD, P.; ARMENGOL, J. Susceptibility of grapevine rootstocks to *Cylindrocarpon liriodendri* and *C. macrodidymum*. **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 3, p. 305-308, 2010.
- FERREIRA, D. F. 2010. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- GARRIDO, L. R.; SÔNEGO, O. R.; URBEN, A. F. *Cylindrocarpon destructans* causador do “pé preto” da videira no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 548-550, 2004.
- GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. **Plant Disease**, v. 95, p. 1040-1055, 2011.
- GUBLER, W. D. et al. Root diseases of grapevines in California and their control. **Australasian Plant Pathology**, v. 33, n. 2, p. 157-165, 2004.
- JASPERS, M. V. BLEACH, C. M.; HARVEY, I. C. Susceptibility of grapevine rootstocks to *Cylindrocarpon* disease. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 46, p. 114, 2007.
- MIELE, A.; RIZZON, L.A.; GIOVANNINI, E. Efeito do porta-enxerto no teor de nutrientes em tecidos da videira Cabernet Sauvignon. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 4, p. 1141- 1149, 2009.
- PINKERTON, J.N.; VASCONCELOS, M.C.; SAMPAIO, T.L.; SHAFFER, R.G. Reaction of grape rootstocks to ring nematode *Mesocriconema xenoplax*. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 56, p.377 - 385, 2005.
- PROTAS, J. F. S; CAMARGO, U. A; MELO, L. M. R. A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas. Bento Gonçalves, 2008. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura>>. Acesso em: 25 ago. 2014.

RAHMAN, M.; PUNJA, Z. K. Factors influencing development of root rot on ginseng caused by *Cylindrocarpon destructans*. **Phytopathology**, v. 95, p. 1381-1390, 2005.

RASERA, N. G. Análise da variabilidade genética de *Cylindrocarpon* spp., associados ao pé-preto da videira, com marcadores RAPD. 2005. 25 f. Trabalho de estágio (Conclusão do Curso Superior de Tecnologia em Viticultura e Enologia. Centro Federal de Educação-Tecnológica de Bento Gonçalves, Bento Gonçalves, 2005.

SANTOS, R F.; DURIGON, M. R.; BLUME, E. Aggressiveness of *Ilyonectriaspp.* and “*Cylindrocarpon*” *pauciseptatum* associated with black foot disease of grapevine. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v. 10, n. 1, p. 49-53, 2015.

SILVA, L. C.; KRETZSCHMAR, A. A.; RUFATO, L.; BRIGHENTI, A. F.; SCHLEMPER, C. Níveis de produção em vinhedos de altitude da cv. Malbec e seus efeitos sobre os compostos fenólicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 675- 680, 2008.